Lane Medical Library

Aus dem Institut für tierärztliche Nahrungsmittekunde der Universität Giessen

Direktor: Professor Dr. med. vet. Richard Standfuss

Über die Verwendbarkeit des Janusgrüns für die Reduktaseprobe der Milch

Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Veterinär-medizinischen Fakultät

der

Ludwigs-Universität zu Giessen

vorgelegt von

Peter Blum

aus Willich (Rhld.)

Giessen 1937

Buchdruckerei Nitschkowski, Giessen

Aus dem Institut für tierärztliche Nahrungsmittekunde der Universität Giessen
Direktor: Professor Dr. med. vet. Richard Standfuss

Über die Verwendbarkeit des Janusgrüns für die Reduktaseprobe der Milch

Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Veterinär-medizinischen Fakultät

der

Ludwigs-Universität zu Giessen

vorgelegt von

Peter Blum
aus Willich (Rhld.)

Giessen 1937
Buchdruckerei Nitschkowski, Giessen

Gedruckt
mit Genehmigung der Veterinär-medizinischen Fakultät zu Giessen

1. Berichterstatter:
Professor Dr. Richard Standfuss.

2. Berichterstatter:
Professor Dr. Beller.

Inhaltsverzeichnis.

A. Einleitung 5
a. Bedeutung der Reduktaseprobe 5
b. Janusgrün 5
c. Methylenblau 6
B. Versuchsanordnung und Arbeitsweise 7
C. Eigene Untersuchungen 9
I. Vorversuche 9
a. Versuchsreihe 1 – 40 zur Ermittlung der geeignetesten Janusgrünnverdünnung . . . 9
II. Hauptversuche 11
a. Versuchsreihe 40 – 85. Vergleichende Untersuchungen mit den geeignetesten Janusgrünverdünnungen gegenüber Methyleblau medicinale 11
b. Versuchsreihe 85 – 110. Vergleich des Methylenblau medicinale mit den anderen Methylenblauarten und mit der als am geeignetesten ermittelten Janusgrünverdünnung von 1:5000 in 20 ccm Milch 17
III. Die Reduktaseprobe mit Fibuverschlüssen . . 18
D. Schlussfolgerung 19
E. Schrifttum 21

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154009_0257

A. Einleitung.

a) Bedeutung der Reduktaseprobe.

Die Reduktase ist ein von den in der Milch vorhandenen Bakterien gebildetes Ferment. Der Gehalt der Milch an Reduktase ist umso grösser, je älter bezw. je bakterienreicher die Milch ist. Zum Nachweis der Reduktase wurde bisher in der Hauptsache mit Methylenblau medicinale gearbeitet. Daneben wurden auch andere Farbstoffe dazu verwandt wie z. B. Indigo, Lackmus, Indigokarmin usw. Jedoch hat sich keiner dieser Farbstoffe bisher so gut eingeführt, wie das Methylenblau. Dieses Untersuchungsverfahren stützt sich auf die Tatsache, dass die Farbstoffe durch die vorhandene Reduktase in ihre entsprechenden Leukoverbindungen übergeführt werden. Es handelt sich bei der Reduktion um sogenannte Küpen- oder Leukoverbindungen. Diese Leukoverbindungen entstehen durch Sauerstoffentzug. Beim Stehen an der Luft können die ursprünglichen chemischen Verbindungen durch den Luftsauerstoff wiederhergestellt werden. In der Milchhygiene wird in weitem Maße der Nachweis der Reduktase durch Reduktion von Methylenblau zur Bestimmung des Frischzustandes bezw. des Keimgehaltes der Milch benutzt.

b) Janusgrün.

Die Anregung zu dieser Arbeit gab eine Bemerkung von M. Klimmer (4) in seinem Buche „Milchkunde", in dem er sagt, dass nach Christiansen Janusgrün insofern besser geeignet sei, als das einmal reduzierte rote Janusgrün durch den Luftsauerstoff nicht mehr in seine ursprüngliche chemische Verbindung zurückgeführt werden könne. Da das Janusgrün in der Milchhygiene zum Nachweis des Reduktionsvermögens von Galtstreptokokken in Traubenzuckerbouillon als sehr brauchbar bekannt ist, schien es lohnend, der Verwendbarkeit des Janusgrüns auch für die Reduktaseprobe der Milch nochmals nachzugehen. Das von Christiansen vorgeschlagene Janusgrün wird innerhalb der ersten Reduktionsstufe von blau-grün über violett nach hellrot umgefärbt. Nach dieser ersten Reduk-

tionsstufe folgt in einer zweiten Stufe die völlige Entfärbung auch der roten Farbe, die wiederum noch längere Zeit in Anspruch nimmt. Diese zweite Reduktionsstufe kommt für die Beurteilung nicht in Betracht, da die Ablesung erfolgt, sobald der Umschlag in rot erfolgt ist. Es kommen zwei Janusgrünarten in den Handel, das Janusgrün B und das Janusgrün G, Janusgrün B wird von den I. G.-Farben, von Dr. K. Hollborn, Leipzig, und von Dr. G. Grübler, Leipzig, hergestellt, das Janusgrün G nur von den I. G.-Farben (Werk Leverkusen). Zu meinen Versuchen wurde das Janusgrün B von allen 3 Firmen, sowie das Janusgrün G verwendet. Janusgrün B ist ein Diaethylsafraninazodimethylanilin mit der chemischen Formel $C_{36}H_{35}N_6Cl$. Es ist ein dunkelgrünes Pulver, das sich gut in Wasser lösen lässt und eine blau-grüne Färbung ergibt. In Säuren ist es ebenfalls löslich. So lässt sich es sich in Salzsäure mit blauer Fabe lösen, während es in Schwefelsäure eine olivgrüne Farbe bildet. In Laugen fällt es aus und bildet einen schwarzen Niederschlag. Christiansen schreibt (nach M. Klimmer [4]) vor, eine 1/100 %ige wässrige sterile Farblösung zu nehmen. Es werden hiernach 10 ccm Milch mit 1 ccm dieser Farblösung versetzt und in einem Wasserbade bei 37° C. gehalten. Es soll nach Christiansen die Frischeabstufung der Milch, an den Reduktionszeiten gemessen, bei Janusgrün ungefähr die gleiche sein, wie bei Methylenblau, mitunter sogar eine schnellere Reduktionszeit sich ergeben.

c. Methylenblau.

Das Methylenblau ist ein Tetramethylthioninchlorid ($C_{16}H_{18}N_3S$ Cl). Es sind dunkelgrüne, glänzende Kristalle, die leicht in kaltem und heissem Waser, schwerer in Alkohol mit stark blauer Farbe löslich sind. Ferner löst es sich in Laugen (Na OH) und Säuren (konz. H_2SO_4). Für die Reduktaseprobe eignen sich am besten die zinkchloridfreien, grünglänzenden Methylenblausorten, dagegen nicht die rotglänzenden zinkchloridhaltigen (M. Klimmer [4]) und das chlorhaltige aber zinkfreie Methylenblau B B. Die heute zur Reduktaseprobe am meisten angewandte Methylenblaulösung besteht aus 5 ccm gesättigter alkoholischer Methylenblaulösung und 195 ccm dest. Wasser. Es gelangten folgende Methylenblauarten, die von den oben erwähnten

Firmen und von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen werden, zur Untersuchung:

Methylenblau medicinale
Methylenblau B
Methylenblau B extra
Methylenblau I. a. D.
Methylenblau B. B.

Es wurden zu sämtlichen Versuchen mit Janusgrün vergleichend Methylenblau medicinale verwandt. Dieses Methylenblau medicinale wurde wiederum an Hand von 25 Versuchen mit den anderen angeführten Methylenblauarten überprüft.

B. Versuchsanordnung u. Arbeitsweise.

Untersucht wurde Frischmilch, die jedesmal von verschiedenen Besitzern stammte, und bei der Anlieferung an die Molkerei dort in unverarbeitetem Zustand den angelieferten Milchkannen entnommen wurde. Die Reagenzgläser, mit denen die Proben ausgeführt wurden, und ebenfalls die Pipetten waren steril. Die Versuche wurden mit 10 und 20 ccm Milch durchgeführt, denen 1 ccm der entsprechenden Farblösung hinzugegeben wurde. Die Proben kamen in den Brutschrank bei einer Bruttemperatur von 37° C. Neben der Reduktaseprobe wurde zur Feststellung des Frischegrades

1. die Alkoholprobe
2. die Kochprobe
3. die Säuregradbestimmung nach Soxhlet-Henkel
4. die Keimzählung nach Breed

vorgenommen.

Die Alkoholprobe.

Bei der Alkoholprobe wurden gleiche Teile, 2 ccm Milch und 2 ccm 68%iger Alkohol, gemischt und festgestellt, ob eine Ausflockung des Kaseins eintrat.

Die Kochprobe.

Bei der Kochprobe wurden etwa 5 ccm Milch über der Gasflamme gekocht. Wie vorher wurde auf etwa eintretende Ausflockung geachtet.

Die Säuregradbestimmung nach Soxhlet-Henkel.

Zur Bestimmung des Säuregrades nach Soxhlet-Henkel wurden 50 ccm Milch in ein geeignetes Glas genommen, 2 ccm einer 2%igen alkoholischen Phenolphthaleinlösung hinzugegeben, worauf mit n/4 Na OH titriert wurde, bis sich eine schwache rosarote Färbung zeigte.

Zur Keimzahlbestimmung wurde das Breed'sche Verfahren genau nach den in den Anweisungen für die Milchuntersuchung in staatlichen Veterinär-Untersuchungsämtern (Rd. Erl. d. Rp. Pr. M. d. I. v. 23. 12. 1935 Vet. 5110/35 Anhang zu B 2. 1.) gegebenen Vorschriften ausgeführt:

Von der gut durchmischten Milch wurde 0,01 ccm Milch mit einer geeigneten vorher sterilisierten Kapillarauslaufpipette entnommen und auf den Objektträger mittels einer besonderen Ausstrichschablone, auf der 4 Felder von 1 qcm nebeneinander vorhanden sind, ausgestrichen. Zum Ausstreichen der Milchmenge wurde eine rechtwinklig abgebogene Nadel von genau 1 cm Länge benutzt. Nach dem Trocknen wurden die Präparate mit folgender Farblösung 2-3 Minuten, die zu gleicher Zeit fixierte, entfettete und färbte, behandelt:

Methylenblau medicinale . .	2 g
Alkohol 95%ig	60 ccm
Xylol	40 ccm
Eisessig	6 ccm

Die überflüssige Farbe wurde durch Einstellen in ein Wasserbad entfernt und nachdem das Präparat völlig lufttrocken war, erfolgte die mikroskopische Untersuchung mit der Oelimmersion. Bei keimarmer Milch wurden 50 Felder, bei keimreicher Milch 30 Gesichtsfelder ausgezählt. Die Summe der Keime wurde durch die Zahl der ausgezählten Gesichtsfelder dividiert und mit dem Faktor 3000 (=der hundertfachen Anzahl von Gesichtsfeldern, die in einem cm^2 enthalten sind) multipliziert. Die Grösse des Gesichtsfeldes wurde mit einem Objektmikrometer, das in hundertstel Millimeter eingeteilt ist, bestimmt, die von der Vergrösserung des Okulars, des Objektivs und der Tubuslänge abhängig ist. Es wurde ein Gesichtsfeld von 0,205 mm eingestellt (M. Klimmer [4] „Milchkunde").

C. Eigene Untersuchungen.

I. Vorversuche.

a) Vorversuchsreihe 1-40.

Die ersten Versuche wurden unternommen, um feststellen, ob

1. die 1/100 %ige Janusgrünverdünnung nach Christiansen die geeigneteste war oder
2. ob durch Verdünnungen bessere und kürzere Reduktionszeiten erzielt werden konnten. Die Versuche wurden im Brutschrank bei 37° C durchgeführt. Die Verdünnungen waren 1:1000 (1/10 %), 1:2000 (1/20 %), 1:2500 (1/25 %), 1:4000 (1/40 %), 1:5000 (1/50 %), 1:8000 (1/80 %), 1:10 000 (1/100 %).

Hierunter fallen 20 Versuche, die mit je 10 ccm Milch durchgeführt wurden, als Vergleichsversuch wurde jedesmal die Reduktaseprobe mit Methylenblau medicinale angesetzt. Die Folgerungen aus diesen Versuchen waren, dass mit zunehmender Konzentration die Farbumschläge mit grösserer Genauigkeit festgestellt werden konnten, dass ferner die Entfärbungszeiten und die Spannzeiten (unter Spannzeit ist die Zeit von dem Augenblick der Einstellung der Probe in den Brutschrank bis zum Beginn der Reduktion zu verstehen Mehlhose [5]) bei den höheren Konzentrationen länger wurden. Die zu hohen Konzentrationen waren daher wegen der viel zu langen Umfärbungszeiten praktisch nicht zu gebrauchen. Wohl kam die von Christiansen angegebene 1/100 %ige Janusgrünlösung der parallel verlaufenden Methylenblauprobe am nächsten (mehrmals war die Janusgrünlösung früher reduziert), aber hier ergaben sich schon einige Schwierigkeiten, insofern der genaue Zeitpunkt des beginnenden und des vollendeten Farbumschlags bei dieser Janusgrünverdünnung nicht sicher erkennbar war. Der bevorstehende Beginn der Reduktion, der Umschlag von blaugrün über violett nach rot, zeigte sich in den meisten Fällen zuerst in oder an der Rahmschicht, in einigen Fällen auch am Boden oder in der Mitte des Reagenzglases.

Um die viel zu langen Reduktionszeiten der bisher angewandten Verdünnungen den praktisch verwendbaren Methylenblaureduktionszeiten näherzubringen, wurden nun

die nächsten 20 Versuche in 10 ccm Milch und in 20 ccm Milch, wodurch zwei verschiedene Verdünnungsgrade geschaffen wurden, durchgeführt, wiederum mit Methylenblau medicinale als Vergleichsversuch. Die Janusgrünkonzentrationen waren wie bei den ersten 20 Versuchen, 1:1000 bis 1:10 000. Bei den Versuchen mit 20 ccm Milch bestanden Konzentrationsverhältnisse von 20 bis 200 000 (s. Tafel 1-5). Ein Teil der Versuche wurde in farbigen Tafeln (5-10) festgelegt, aus denen die Spannzeit, der Beginn und das Ende der Reduktionszeit zu erkennen ist. Folgende Farbtöne wurden den Tafeln zugrunde gelegt, die sich nach je $^1/_4$ Stunde ergaben:

blau
violett und
rot.

Nach Einbringen des Farbstoffes sieht die Milch blaugrün aus. Violett stellt den Beginn der Reduktion dar und rot die vollendete Reduktion. Während des Farbumschlages von blaugrün über violett nach rot treten verschiedene Zwischenfarbtöne auf, die jedoch nicht aufgezeichnet wurden. Auch trat niemals eine deutliche Rotfärbung der Probe ein, immer war ein leicht violetter Schimmer vorhanden, welcher die Erkennung des vollendeten Farbumschlages schwieriger gestaltete.

An Hand dieser Versuche konnte festgestellt werden, dass die schwächsten Konzentrationen durch eine meistens kürzere Reduktionszeit des Janusgrüns als des Methylenblaus gekennzeichnet waren. Die Spann- und Reduktionszeiten waren kürzer und gleichmässiger als bei höheren Konzentrationen. Die Konzentration 1:10000 in 20 ccm, färbte die Milch nur sehr schwach, sodass die Reduktion nur schlecht zu erkennen war. Dagegen war der Farbumschlag bei einer Konzentration 1:8000 in 20 ccm Milch noch eben erkennbar. Erwähnenswert ist noch die Tatsache, dass sich die Konzentration von 1:100 000, die sich bei Anwendung einer 1/100 %igen Janusgrünlösung in 10 ccm Milch ergibt, anders verhält, als die auf Milch bezogene gleiche Konzentration (1:100 000), die sich bei Anwendung einer 1/50 %igen Janusgrünlösung in 20 ccm Milch ergibt. In 20 ccm Milch war die Spannzeit meistens kürzer, die Reduktion früher erreicht und der Farbumschlag trat deutlicher in Erscheinung. Es

wurde die Fesstellung gemacht, dass selbst eine 1/80 %ige Janusgrünlösung in 20 ccm Milch (Konzentration mit Milch= 160 000), was die Erkennung des Farbtones anbelangt, noch besser erkennbare Farbumschläge ergab, als die von Christiansen angegebene 1/100 %ige Lösung in 10 ccm Milch.

II. Hauptversuche.

a) Versuchsreihe 40-85.

Auf Grund dieser Feststellung wurden nun die Hauptversuche nur noch in 20 ccm + 1 ccm der entsprechenden Janusgrünverdünnung durchgeführt. Folgende Verdünnungen, die sich bisher als die besten erwiesen hatten, gelangten zur Untersuchung: 1/40 %ige, 1/50 %ige und 1/80 %ige Janusgrünlösung in 20 ccm Milch. Mit der Milch zusammen ergaben sich Verdünngen von 1:80 000, 1:100 000 und 1:160000. Ferner wurden die Janusgrünarten von den auf Seite 6 angegebenen Firmen mit in die Versuchsreihe eingeschaltet, (siehe Tafel 4 und 5) (bisher war nur das Janusgrün B von Dr. K. Hollborn, Leipzig, verwendet worden). Als Vergleichsprobe wurde wiederum die Methylenblaureduktase mit Methylenblau medicinale gewählt. Zur Untersuchung kamen 45 Milchproben. Die Ergebnisse dieser Versuche waren, was die einzelnen Janusgrünarten anbetrifft, folgende:

1. Das Janusgrün B verhält sich nach allen Versuchen gleichartig (siehe Tafel 4 und 5). Die Reduktionszeiten schwanken bei guter, also keimarmer Milch manchmal um 5-10-15 Minuten, die jedoch für die Qualitätsbewertung der Milch nicht von Bedeutung sind.
2. Das Janusgrün G ist ebenfalls reduzierbar. Die Reduktionszeiten zogen sich jedoch gegenüber dem Janusgrün B um eine 4-6 mal längere Zeit hin. Aus diesem Grunde wurde dieses Janusgrün nach 15 Versuchen ausgeschaltet.

Die nun folgenden Hauptversuche sollten zeigen, ob und wie gross die Unterschiede in den Spann- und Entfärbungszeiten des Janusgrüns B und des Methylenblaus medicinale sind, ausserdem ob die Unterschiede der drei angewandten Janusgrünverdünnungen so erheblich sind, dass hieraus Nutzanwendungen gezogen werden könnten.

Wie in den Vorversuchsreihen zeigten die schwächeren Konzentrationen die kürzere Spann- und Reduktionszeit. Zum Teil sind beide Zeiten kürzer als die des Methylenblaus.

In der nachfolgenden Tafel sind 5 Versuche aus den 45 Versuchen herausgenommen, aus denen die einzelnen Zeiten (Spann- und Reduktionszeiten) zu entnehmen sind. Die 3 Tafeln behandeln jedesmal dieselben Versuche, nur liegt jeder Tafel eine andere Janusgrünkonzentration zu Grunde.

Tafel I.

Methylenblau medicinale Janusgrün B Konz. 1:80 000.

Versuch Nr.	Spannzeit	Beginn der Redukt.	Ende der Redukt.	Spannzeit	Beginn der Redukt.	Ende der Redukt.	Ungefähre Keimzahl
17	7.30	7.30	8.30	7.30	7.30	8.30	300 000
23	9	9	10	8	8	8.30	270 000
25	5	5	5.30	4.15	4.15	5.15	600 000
29	3.15	3.15	4	3.15	3.15	3.45	2 600 000
41	7	7	7.45	6.30	6.30	7	380 000

Tafel II.

Methylenblau medicinale Janusgrün B Konz. 1:100 000.

Versuch Nr.	Spannzeit	Beginn der Redukt.	Ende der Redukt.	Spannzeit	Beginn der Redukt.	Ende der Redukt.	Ungefähre Keimzahl
17	wie in Tafel I			7.40	7.30	8.15	300 000
23				8	8	45	270 000
25				4.25	4.15	5	600 000
29				3	3	3.30	2 600 000
41				6.15	6.15	6.45	380 000

Tafel III.

Methylenblau medicinale Janusgrün B Konz. 1:160 000.

Versuch Nr.	Spannzeit	Beginn der Redukt.	Ende der Redukt.	Spannzeit	Beginn der Redukt.	Ende der Redukt.	Ungefähre Keimzahl
17	wie in Tafel I			7.30	7.30	8	300 000
23				7.45	7.45	8.30	270 000
25				4	4	4.45	600 000
29				3	3	3.15	2 600 000
41				6.15	6.15	6.30	380 000

Die einzelnen Zeiten wurden nach je $^1/_4$ Stunde vermerkt. Es können zwischen den einzelnen angegebenen Zeiten Zeitunterschiede von 7 Minuten vorhanden sein, da immer auf $^1/_4$ Stunde abgerundet wurde. Selbstverständlich nur bei Versuchen, die sich über mehrere Stunden hinzogen, da hier die geringen Zeitverschiebungen praktisch ohne Bedeutung sind.

Die Versuche 17, 23, 25, 29 und 41 zeigten, dass die Janusgrünverdünnungen von 1 : 160 000, auf die Milch bezogen, kürzere Reduktionszeiten als die Methylenblauproben aufweisen, dass aber die Farbumschläge ziemlich schwierig zu erkennen waren. Viel besser und deutlicher traten dagegen die Farbumschläge bei den Janusverdünnungen 1:100 000, ebenfalls auf die Milch bezogen, hervor. Die Zeitunterschiede zwischen diesen Verdünnungsgraden liegen nur wenig auseinander. Die Tafel II von Seite 13 entspricht ungefähr der Tafel auf Seite 17.

In der nachstehenden Tafel folgen im einzelnen, nach der Länge der Reduktionszeit geordnet, die 45 Hauptversuche. Die Versuche Nr. 17, 23, 25, 29 und 41 aus der vorherigen Tafel entsprechen in der nachstehenden Tafel Nr. 3, 1, 11, 17 und 6.

Beendigung der Reduktion.

Versuch Nr.	Janusgrün B mit Konz. v. 1:80 000	1:100 000	1:160 000	Methylenblau medicinale	ungefähre Keimzahl	Ergebnis
	n. Std.	n. Std.	n. Std.	n. Std.		
1	8.45	8.45	8.30	9	270 000	–
2	8.30	8.15	8	8.45	300 000	–
3	8.30	8.15	8	8.30	300 000	–
4	8.45	8.45	8.30	10	160 000	–
5	7.15	7.15	7	7.45	240 000	–
6	7	6.45	6.30	7.45	380 000	–
7	7.15	7	6.45	7.45	300 000	–
8	6.45	6.15	6.15	7	500 000	–
9	6.45	6.30	6.15	7.15	300 000	–
10	6	5.45	5.30	6	550 000	–
11	5.15	5	4.45	5.30	600 000	–
12	5	4.30	4.15	5.15	700 000	–
13	5.15	5	4.30	5.30	550 000	–
14	4.30	4	3.45	4.30	2 000 000	–+
15	3	3	2.30	3	3 000 000	–+
16	2.30	2.15	2.15	2.15	6 000 000	–+
17	3.45	3.30	3.15	4	2 600 000	–
18	2	1.45	1.45	1.45	5 500 000	–+
19	1.15	1.15	1.15	1.15	12 000 000	–+
20	1.45	1.30	1.30	1.30	8 000 000	–+
21	1.15	1.15	1	1	6 000 000	+
22	1	1	1	1	9 000 000	–+
23	1.15	1	1	1	7 600 000	–+
24	1.15	1	1	1	9 000 000	–+
	n. Min.	n. Min.	n. Min.	n. Min.		
25	55	50	50	50	15 000 000	–+
26	60	55	50	50	12 000 000	+
27	45	45	45	45	18 000 000	–+
28	50	50	45	35	18 600 000	+
29	45	40	40	40	12 000 000	–+
30	35	35	30	30	üb. 20 000 000	+
31	30	30	30	25	20 600 000	+
32	35	35	30	30	19 200 000	+
33	34	30	30	30	üb. 20 000 000	–+
34	30	25	25	20	üb. 20 000 000	+
35	20	20	20	20	üb. 20 000 000	+
36	20	17	15	10	üb. 20 000 000	+
37	19	17	15	15	üb. 20 000 000	+
38	17	15	15	15	üb. 20 000 000	–+
39	7	6	6	6	üb. 20 000 000	–+

Beendigung der Reduktion.

Versuch-Nr.	Janusgrün B mit Konz. v. 1:80 000	1:100 000	1:160 000	Methylenblau medicinale	ungefähre Keimzahl	Ergebnis
	n. Min.	n. Min.	n. Min.	n. Min.		
40	6	6	6	6	üb. 20 000 000	−+
41	6	5	5	5	üb. 20 000 000	−+
	n. Std.	n. Std.	n. Std.	n. Std.		
42	3.45	3.30	3.30	3.45	2 600 000	−
43	3	2.45	2.45	3.30	2 300 000	−
44	5.30	5.15	5	6	450 000	−
45	2	1.45	1.30	1.15	10 000 000	+

Erklärung der Zeichen − und +:

− = die Janusgrünreduktion war kürzer
+ = die Methylenblaureduktion war kürzer
−+ = beide Reduktionen waren gleichzeitig beendet.

Von den angeführten 45 Versuchen waren in 17 Versuchen die Spann- und Reduktionszeiten des Janusgrüns kürzer als die des Methylenblaus. 19 Versuche beendigten die Reduktion zu gleicher Zeit. In 9 Versuchen war das Methylenblau schneller entfärbt als es zur roten Reduktionsstufe des Janusgrüns gekommen war.

Nach den bei diesen Versuchen gemachten Beobachtungen liegt der Unterschied, dass einmal Janusgrün, das andere Mal Methylenblau schneller reduziert war, in der Keimzahl begründet. Bei guter Milch, also Milch mit einem geringen Keimgehalt, war bei allen Versuchen das Janusgrün früher in seine rote, erste Reduktionsstufe übergeführt, als es zur Entfärbung des Methylenblau kam. Je grösser nun der Keimgehalt der Milch wird, um so mehr nähern sich die Reduktionszeiten der beiden Farbstoffe. Zu berücksichtigen sind jedesmal die Konzentrationen des Janusgrüns. Milch mit Reduktionszeiten von 15 Minuten bis zu 2 Stunden ergab keine deutlichen Unterschiede. Bei hohem Keimgehalt, also bei Milch mit Reduktionszeiten unter 15 Minuten, kam es sehr oft zur schnelleren Entfärbung des Methylenblau als zur ersten Reduktionsstufe des Janusgrün. Bei diesen kurzen Reduktionszeiten war es sehr schwer, bei Janusgrün den Augenblick des vollendeten Farbumschlages festzustellen.

Nach der Beschaffenheit der Milch würden sich für die beiden Farbstoffe folgende Reduktionszeiten ergeben:

Beschaffenheit der Milch	Umfärbung des Janusgrüns	Umfärbung des Methylenblaus	Ungefähre Keimzählg.
gut	n. 4.45 Std.	n. 5.30 Std.	bis 600 000
mittel	n. 2—4.45 Std.	n. 2—5.30 Std.	1/2—4 Mill.
schlecht	n. 30 Min.—2 Std.	n. 30 Min.—2 Std.	4—20 Mill.
sehr schlecht	n. 1 Min.—30 Min.	n. 1 Min—20 Min.	über 20 Mill.

b) Versuchsreihe 85-110.

Vergleich des Methylenblau medicinale mit den anderen Methylenblauarten und mit der als am geeignetsten ermittelten Janusgrünverdünnung von 1:5000 in 20 ccm Milch.

Bei der Verschiedenheit der Methylenblaupräparate, die in den Handel kommen, war es notwendig, die einzelnen Präparate untereinander zu überprüfen. Es kamen die auf Seite 7 angegebenen Methylenblauarten zur Untersuchung.

Das Methylenblau B B wurde nach 10 Versuchen ausgeschaltet, weil die Farblösung, nach der vorgeschriebenen Menge angesetzt, so schwach war, dass sie in der Milch kaum erkannt werden konnte. Diese Versuche sollten Aufschluss darüber geben, wie weit oder ob die einzelnen Fabrikate andere Reduktionszeiten ergaben. In dieser Versuchsreihe wurden die Vergleichsversuche mit Janusgrün (1:50 %ige Lösung in 20 ccm Milch) ausgeführt.

Ferner wurden zwei zu verschiedenen Zeiten von den I. G.-Farben bezogene Methylenblau medicinale-Präparate bei diesen Proben verwandt, um die Haltbarkeit der Stammlösungen festzustellen. Während das Methylenblau medicinale I (wie es in der folgenden Tafel bezeichnet ist) 7 Wochen alt war, war das Methylenblau medicinale II neu bezogen.

Von den 25 Versuchen wurden 10 Versuche herausgenommen, die alle ungefähr 1 Stunde Zeitunterschied aufweisen:

Methylenblau.

Nr.	medicinale I	medicinale II	B extra	B	I. a. D.	Janusgrün	Keimzahl
	Std.	Std.	Std.	Std.	Std.	Std.	
1	8.30	8.15	8.15	8.30	8.45	7.30	180 000
2	7	6.45	6.45	7.15	7.15	6.15	230 000
3	6.15	5.45	5.45	6.15	6.15	5.15	400 000
4	5	4.45	4.45	5.15	5.15	4.15	600 000
5	4.15	4	4	4.15	4.15	4.45	1,3 Mill.
6	3	2.30	2.30	2.45	2.45	2.30	3,5 Mill.
7	2.15	2	2	2.15	2.15	2.15	4,3 Mill.
8	1.15	1	1	1.15	1.15	1.15	6,6 Mill.
	n. Min.	n. Min.	n. Min.	n. Min.	n. Min.	n. Min.	
9	45	40	40	45	45	45	16,3 Mill.
10	10	7	6	10	10	15	üb. 20 Mill.

Aus diesen Versuchen ergibt sich demnach, dass die einzelnen Methylenblauarten unter sich nicht ganz gleichwertig sind, dass die Unterschiede um so mehr zurückgehen, je schlechter die Milch, d. h. je höher der Keimgehalt der Milch ist, dass das Alter der Stammlösung für die Beurteilung der Milch eine wesentliche Rolle spielt. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, ist das ältere Methylenblau I schon um mindestens $^1/_4$ Stunde später reduzierbar als das frischere Methylenblau II.

Die kürzesten Reduktionszeiten weisen der Reihe nach auf:

1. Methylenblau B extra,
2. Methylenblau medicinale,
3. Methylenblau I. a. D. und B.

Eine praktische Bedeutung können diese Zeitunterschiede jedoch nicht darstellen, weil die Zeitunterschiede sich nur bei Milch mit geringem Keimgehalt einstellen und weil bei solcher Milch Reduktionsunterschiede von $^1/_4 - ^1/_2$ Stunde für die Beurteilung des Frischegrades belanglos sind.

III. Reduktaseprobe mit Fibuverschlüssen.

Die Methylenblau-Reduktaseprobe wurde von dem Engländer Wilson (12) (Lit. Tierärztl. Rundschau, 42. Jg., Nr. 27, S. 535. The modified methylene blue reduction best for the grading of raw milk on the basis of bacterial cleanliness) insofern abgeändert, als die Reagenzgläser mit Fibuverschlüssen verschlossen werden. Die Proben wurden

nach je $^1/_4$ Stunde durch Umkehren der Reagenzgläser geschüttelt. Hierdurch sollen die Reduktionszeiten erheblich verkürzt und die die Reduktion veranlassenden Bakterien gleichmässig in die Milch verteilt werden.

Es wurden 50 Versuche mit Fibuverschlüssen durchgeführt und zwar Parallelversuche mit Methylenblau medicinale und Janusgrün (1/50 %ige Lösung in 20 ccm Milch) mit und ohne Verschlüssen. Die Verschlüsse wurden nach jeweiligem Gebrauch sterilisiert, die Reduktaseproben nach je $^1/_4$ Stunde gut durchgemischt, um eine ungefähre Verteilung der Bakterien im Reagenzgläschen zu erhalten.

Eine wesentliche Verkürzung der Reduktionszeiten trat bei keinem Versuch auf. Auch hier traten Schwankungen von $^1/_4 - ^1/_2$ Stunde auf und zwar trat diese Verkürzung der Reduktionszeiten nur bei Milch mit einem geringen Keimgehalt in Erscheinung. Bei sehr vielen Versuchen blieb die Schüttelprobe hinter den Vergleichsproben zurück. Es wurden mehrmals längere Reduktionszeiten beobachtet.

D. Schlussfolgerung.

1. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Reduktaseprobe sowohl mit Methylenblau als auch mit Janusgrün ein Verfahren darstellt, das den Frischegrad der Milch anzeigt, wobei es weniger auf die Menge der Keime als auf deren Aktivität ankommt.
2. Von den beiden Janusgrünpräparaten eignet sich nur das Janusgrün B. Wohl wird das Janusgrün G durch die Reduktase in die erste (rote) Reduktionsstufe übergeführt, jedoch ziehen sich die Reduktionseiten um eine 4–6 mal längere Zeit hin.
3. Die 1/40 %ige, 1/50 %ige und 1/80 %ige Janusgrünlösung in 20 ccm ergibt kürzere Reduktionszeiten und bessere Farbumschläge als die von Christiansen vorgeschlagenen Janusgrünlösung (1/100 %ige Lösung in 10 ccm Milch).
4. Ein Vergleich der einzelnen Janusgrünkonzentrationen zeigt, dass im allgmeinen die 1/50 %ige Lösung in 20 ccm Milch der Methylenblaureduktase am nächsten kommt, der vollendete Farbumschlag noch einigermassen zu ermitteln ist.

5. Gute, keimarme Milch zeigt mit Janusgrün bei fast allen Versuchen eine kürzere Reduktionszeit als Methylenblau. Allerdings setzt die Erkennung der beendigten Reduktion (rote Reduktionsstufe) eine gewisse Übung voraus.
6. Ein erheblicher Vorzug kommt der Janusgrünreaktion gegenüber der bisher gebräuchlichen Methylenblaureaktion nicht zu, denn der Vorzug des Janusgrüns gegenüber dem Methylenblau, dass die rote Reduktionsstufe nicht wandelbar ist, ist praktisch nicht von Bedeutung, da ja die Proben nicht geschüttelt werden und die rückkehrende Blaufärbung sich zuerst oben im Reagenzglas und ganz allmählich einstellt.
   Bei der Janusgrünreaktion ist vor allen Dingen die Schwierigkeit der Erkennung der vollendeten Reduktion ein grosser Nachteil.
7. Von den einzelnen Methylenblaupräparaten zeigten Methylenblau B extra und Methylenblau medicinale eine weitgehende Übereinstimmung. Eine etwas längere Reduktionszeit, aber nur bei keimarmer Milch zeigten Methylenblau I. a. D. und Methylenblau B. Das Methylenblau B B eignet sich nicht zur Feststellung des Frischegrades.
8. Die von dem Engländer Wilson gemachten Beobachtungen, dass mittels Fibuverschlüsse eine Verkürzung der Reduktionszeiten eintreten soll, können nicht bestätigt werden.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Richard Standfuss meinen verbindlichen Dank aussprechen für die Überlassung vorliegender Arbeit und die mir stets gerne gewährte Unterstützung in Rat und Tat.

Schrifttum.

1. Ernst, W. Grundriss der Milchhygiene für Tierärzte.
2. Fleischmann-Weigmann. Lehrbuch der Milchwirtschaft.
3. Grimmer, W. Lehrbuch der Chemie und Physiologie der Milch.
4. Klimmer, M. Milchkunde.
5. Mehlhose. Einige Reduktaseversuche unter besonderer Berücksichtigung der Janusgrünreduktase. Süddeutsche Molkereizeitung, Kempten im Allgäu, Nr. 38, 1936.
6. Pesch, K. Die Resazurolprobe. Neue Schnellbestimmungsmethode zur Beurteilung des Keimgehaltes der Milch. Süddeutsche Molkereizeitung, Kempten im Allgäu Nr. 43, 1928.
7. Pesch und Simmert. Eine neue Resazurin-Reduktionsprobe für Milchuntersuchung. Süddeutsche Molkereizeitung, Kempten im Allgäu, 30. J., 1929.
8. Rievel, H. Handbuch für Milchkunde.
9. Stork, W. Reduktaseprobe mit Azarufin zur Beurteilung der Frischmilch, Süddeutsche Molkereizeitung, Kempten im Allgäu, Nr. 38, 1936.
10. Thornston und Hastings. Journal of baet. S. 319, 1929. Studies on oxidation-reduction in milk.
11. Viertbauer, R. Milchwirtschaftliche Forschungen 1929, S. 631.
12. Wilson. The modified methylene blue reduction best for the grading of raw milk on the basis of bacterial cleanliness. (The Vet. Rec. Bd. 16, S. 494–497). (Eine abgeänderte Methylenblaureduktionsmethode zur Bestimmung des Reinheitsgrades roher Milch). Tierärztliche Rundschau Nr. 27, 1936.

Tafel IV. Reduktaseprobe in 20 ccm Milch mit

Versuch Nr.	Janusgrün B der Firmen									Methylenblau medicinale	Alkoholprobe	Kochprobe	Säuregrad	Keimzahl	Ergebnis
	Dr. Holborn			Dr. Grübler			I. G.-Farben								
nach Verdünnung	1:4000	1:5000	1:8000	1:4000	1:5000	1:8000	1:4000	1:5000	1:8000						
Beginn der Reduktion nach	5.30	5.30	5.15	5.30	5.30	5.15	5.30	5.30	5.15	5.45	negativ	negativ	6,6	300 000	–
Ende nach	6.30	6.30	6.15	3.20	6.30	6.15	6.30	6.30	6.15	7.15					
Beginn der Reduktion nach	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	negativ	negativ	6,4	500 000	–
Ende nach	6.15	6.15	6	6.15	6.15	6	6.15	6.15	6	7					
Beginn der Reduktion nach	4.45	4.45	4.45	4.45	4.45	4.45	4.45	4.45	4.45	4.45	negativ	negativ	6,2	500 000	–
Ende nach	5.45	5.45	5.30	5.45	5.45	5.30	5.45	5.45	5.30	6					
Beginn der Reduktion nach	3.30	3.30	3.30	3.30	3.30	3.30	3.30	3.30	3.30	3.45	negativ	negativ	6,4	700 000	–
Ende nach	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	5.45					
Beginn der Reduktion nach	2.15	2.15	2.15	2.15	2.15	2.15	2.15	2.15	2.15	2.15	negativ	negativ	7	2 Mill.	–
Ende nach	4	4	3.30	3.45	3.45	3.30	4	3.45	3.45	4 30					

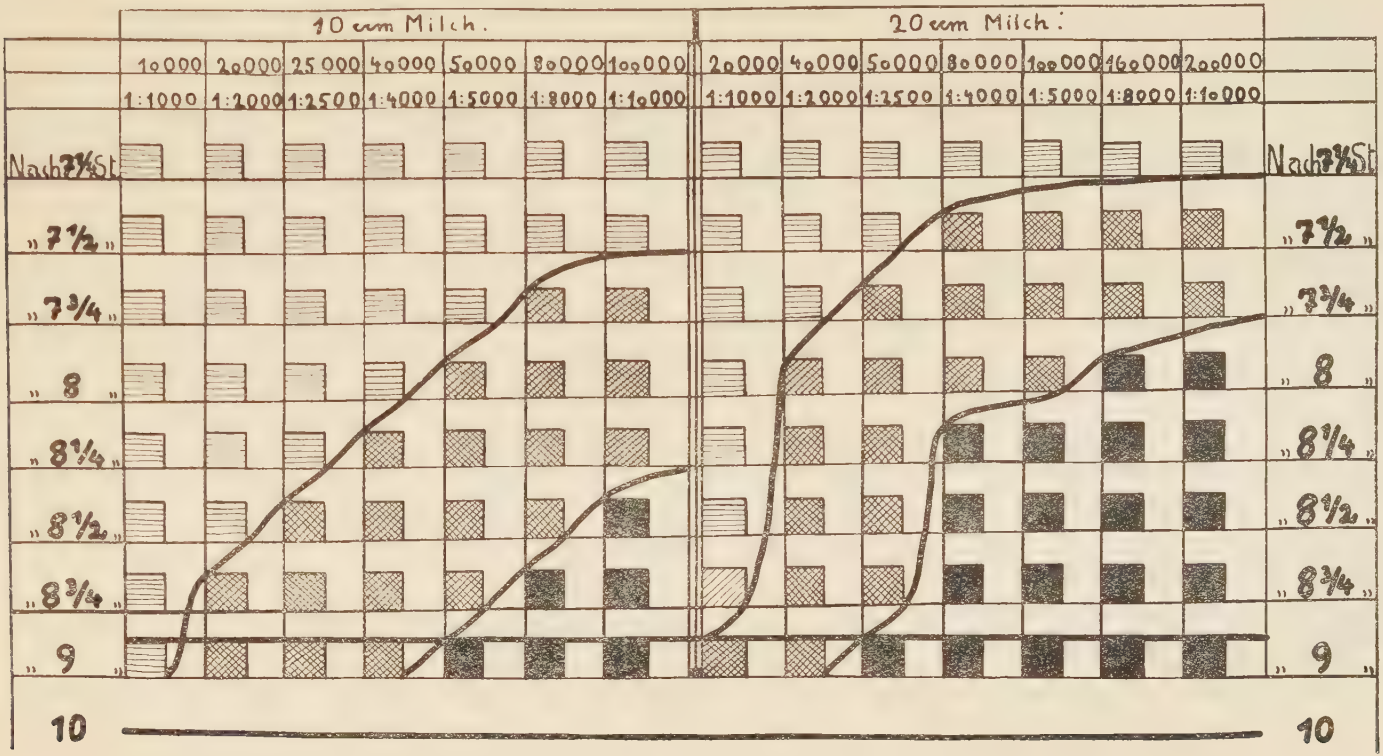
Diese Tafeln (IV und V) geben Aufschluss über das Reduktionsvermögen der einzelnen Janusgrünarten und über ihren Gebrauchswert. Die Unterschiede betragen nur wenige Minuten. Das Janusgrün G wurde, wie schon erwähnt, nach den ersten 15 Versuchen ausgeschaltet, weil es, an den Reduktionszeiten gemessen, praktisch nicht verwandt werden kann. + = positiv für Methylenblau; − = positiv für Janusgrün; −+ = die beiden Farbstoffe (Janusgrün und Methylenblau) weisen dieselben Reduktionszeiten auf.

Tafel V.

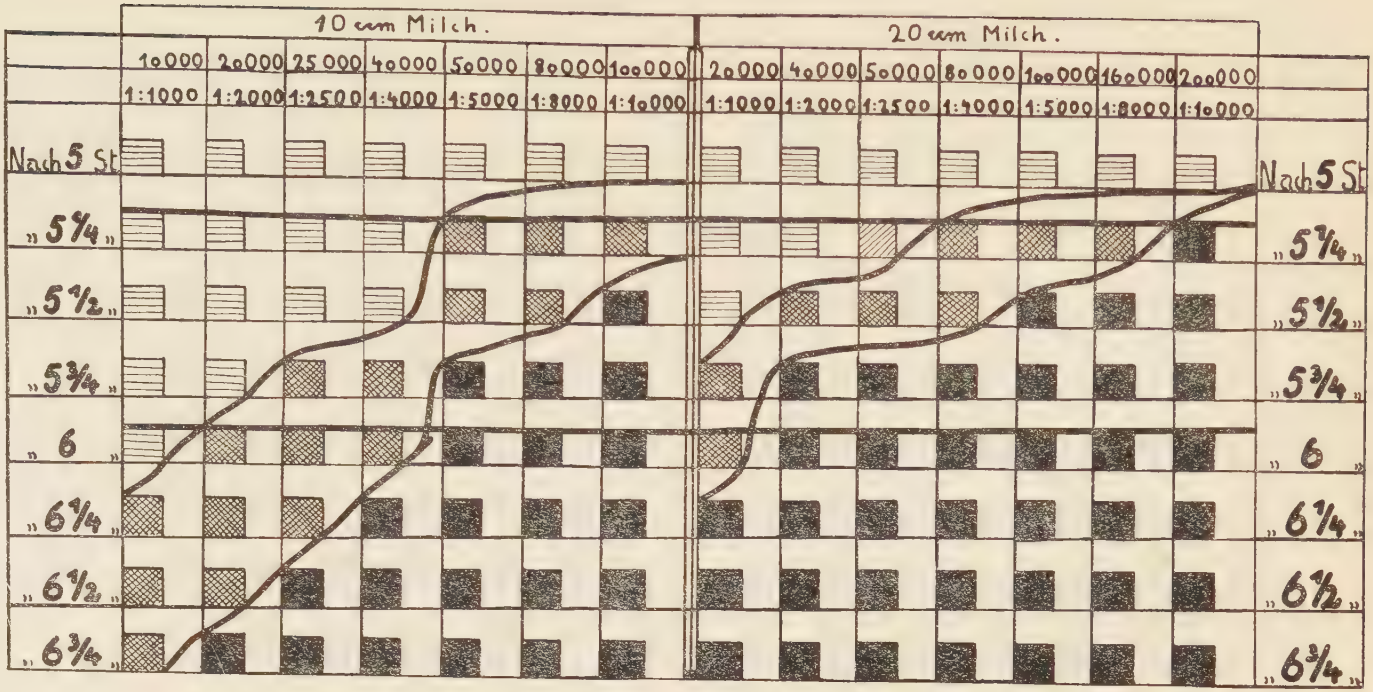
Reduktaseprobe in 20 ccm Milch mit

Versuch Nr.	Janusgrün B der Firmen									Methylenblau medicinale	Alkoholprobe	Kochprobe	Säuregrad	Keimzahl	Ergebnis
	Dr. Holborn			Dr. Grübler			I. G.-Farben								
nach Verdünnung	1:4000	1:5000	1:8000	1:4000	1:5000	1:8000	1:4000	1:5000	1:8000						
Beginn der Reduktion nach	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1,45	1.30					
Ende nach	2.45	2.30	2	2.45	2.30	2	2.30	2.30	2	3	negativ	negativ	7,2	3 Mill.	–
Beginn der Reduktion nach	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2					
Ende nach	3	3	2.45	3	2.45	2.30	3	2.45	2.30	3	negativ	negativ	7	550 000	–
Beginn der Reduktion nach	1.30	1.30	1.15	1.30	1.30	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15					
Ende nach	2	2	1.45	2	2	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	negativ	negativ	7,4	550 000	+
Beginn der Reduktion nach	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30 Min.					
Ende nach	60	60	60	60	60	55	60	60	55	60 Min.	negativ	negativ	7,6	9 Mill.	–+
Beginn der Reduktion nach	7	7	7	7	7	7	7	7	6	7 Min.					
Ende nach	20	20	15	25	25	15	20	20	15	20 Min.	negativ	negativ	9,2	üb. 20 Mill.	–+

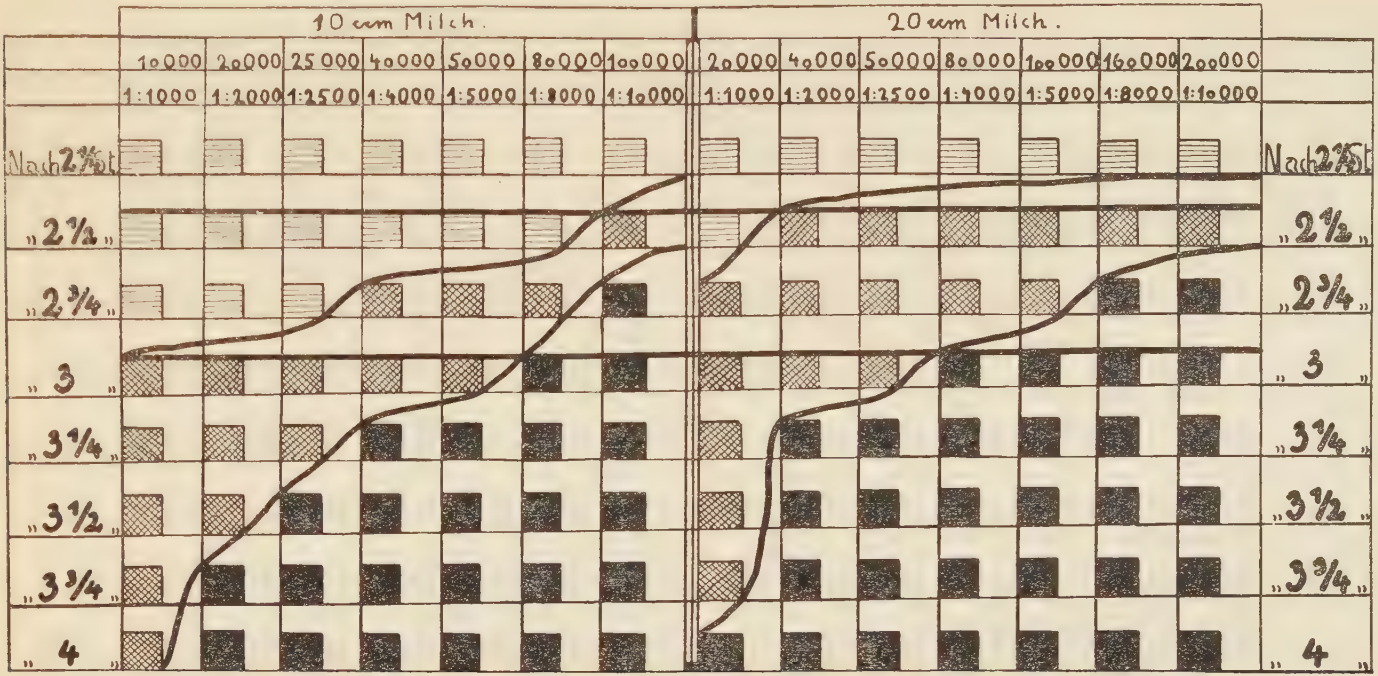
Talel VI. Farbreaktionen mit Janusgrün.



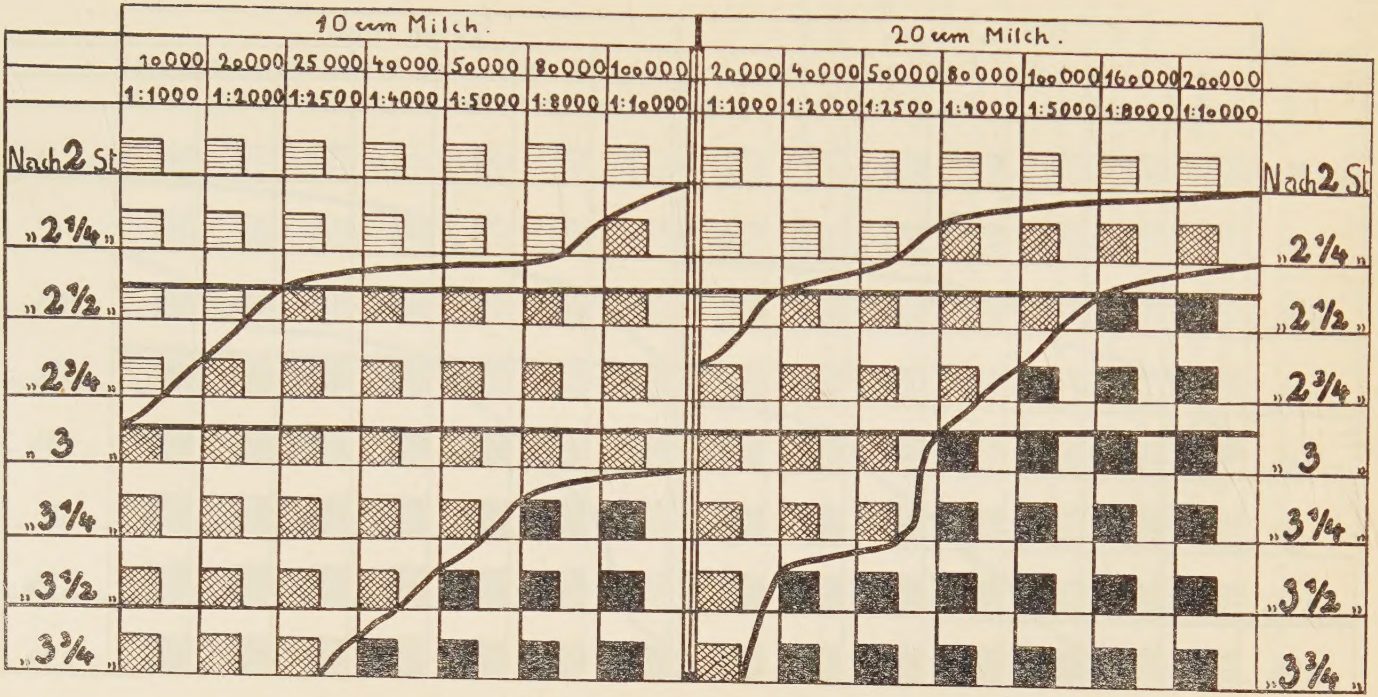
Tafel VII. Farbreaktionen mit Janusgrün.



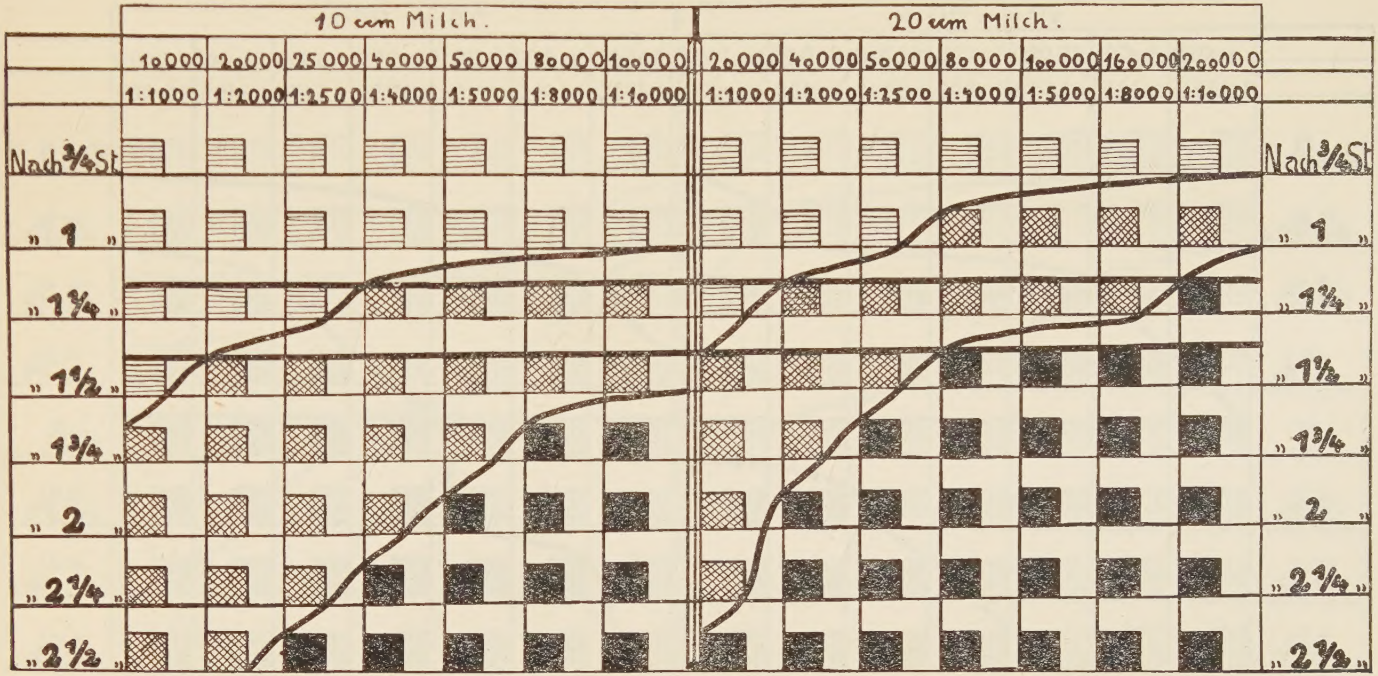
Tafel VIII. Farbreaktionen mit Janusgrün.



Tafel IX. Farbreaktionen mit Janusgrün.



Tafel X. Farbreaktionen mit Janusgrün.



Erklärungen für die Tafeln V – X.

Diese Tafeln, die ursprünglich in Farben angelegt wurden, sind im Druck folgendermassen abgeändert worden:

Blau = durch wagerechte Strichelung,
violett = durch gitterförmige Strichelung
rot = durch vollkommen schwarz ausgefüllte Quadrate.

Diese Tafeln stellen die Umfärbung des Janusgrüns mit den verschiedenen Farbreaktionen dar. Während die schräg verlaufenden Linien die Spann- und Umfärbungszeit zum Ausdruck bringen, bedeuten die gerade durchgehend verlaufenden Linien die Reduktion des Methylenblaus und zwar zeigt die obere Linie den Beginn und die untere Linie den Endpunkt der Reduktion an.

In den Tafeln bedeutet die oberste Zahlenreihe die Verdünnung des Farbstoffes auf die Milch bezogen (gesamte Konzentration), die darunter stehende Zahlenreihe die Janusgrünverdünnung (die %ige Lösung) an sich.

Es wurden 5 Tafeln mit 5 verschiedenen langen und kurzen Reduktionszeiten gewählt, um das Verhalten des Janusgrüns bei keimarmer und keimreicher Milch zu zeigen.

Lebenslauf.

Ich, Peter Blum, wurde am 17. August 1911 als Sohn des Landwirts Wilhelm Blum und seiner Ehefrau Franziska, geborene Langels in Willich (Rhld.) geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Willich trat ich in das Realgymnasium zu Opladen ein. Nach dreijährigem Besuch dieses Gymnasiums kam ich zum Realgymnasium nach Krefeld, woselbst ich Ostern 1932 mein Abitur bestand. Seit dieser Zeit widmete ich mich dem Studium der Veterinärmedizin in Giessen und München. Nach 9 Semestern legte ich in Giessen das veterinär-medizinische Staatsexamen ab. Seit dieser Zeit bin ich Schlachthofpraktikant am Schlachthof in Giessen.